

กระบวนการตกตะกอนและความคงตัวของบรอมีเลน

Precipitating Process and Stability of Bromelain Activity

ทนง ภักฐพันธ์ และ อรวินท์ วงศ์มีเกียรติ¹

Thanong Pukrushpan and Orwin Vongmekiat

ABSTRACT

Factors affecting enzyme precipitation and precipitating processes of bromelain extracted from pineapple stem, and its stabilization process were studied. Bromelain was extracted from pineapple stem by blending with equal amount of water. After filtration, the juice was adjusted for pH 4.3 before being subsequently precipitated with 33% and 56% acetone. This process yields 0.48-0.58% enzyme powder with activity about 1300 CDU/mg enzyme powder. This white enzyme powder contained higher activity than the commercial one. Loss of bromelain activity during storage at 5°C was only 27%, while at room temperature was about 40%, within two months. Addition 572 ppm Na₂S or Na₂S₂O₅ in the extract before precipitation will retain more activity. Only 13.6% of the activity of the treated enzyme was lost at the end of 2 months.

บทคัดย่อ

คำนำ

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตกตะกอนและเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนบรอมีเลนจากลำต้นสับประรดอายุ 3 ปี และศึกษาความคงตัวของปฏิกิริยาการทำงานของบรอมีเลน โดยการสกัดบรอมีเลนจากลำต้นด้วยการตีปั่นกับน้ำกลั่น เหวี่ยงแยกตะกอน ปรับ pH เป็น 4.3 แล้วตกตะกอนด้วยอะซีโตนเป็นสองขั้นตอนคือครั้งแรกตกตะกอนด้วยอะซีโตน 33% และตามด้วย 56% จะได้ผลผลิต 0.48-0.58% ของน้ำหนักลำต้นสับประรด ซึ่งดีกว่าวิธีอื่น ๆ บรอมีเลนมีปฏิกิริยา 1300 CDU ต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ผงที่ได้ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาด ส่วนความคงตัวของเอนไซม์ในการเก็บรักษาปรากฏว่าการเก็บบรอมีเลนที่ห้องเย็น (5°C) จะช่วยลดการสูญเสียของปฏิกิริยาเอนไซม์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง โดยปฏิกิริยาจะลดลงเพียง 27% ของปฏิกิริยาเริ่มต้น ขณะที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลดลงถึง 40% เมื่อเก็บไว้ 2 เดือน การเติมโซเดียมซัลไฟด์และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 572 ส่วนในล้านส่วนลงในสารสกัดก่อนตกตะกอนจะเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ ปฏิกิริยาจะสูญหายไปเพียง 13.6% เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน

การสกัดเอนไซม์บรอมีเลนจากลำต้นสับประรดโดยวิธีที่ใช้อยู่ทั่วไป (Heinicke, 1961) จะมีการปะปนของแป้ง ผลึกแคลเซียมออกซาลาเลท สารแขวนลอย น้ำตาล กลีโค โปรตีน ไขมัน และสารตกตะกอนอื่น ๆ อีกมาก สิ่งปะปนเหล่านี้จำเป็นต้องแยกออกจากเอนไซม์เพื่อความเหมาะสมในการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ต่อไป Su และคณะ (1975) ได้ศึกษาการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอลกอฮอล์ แอมโมเนียมซัลเฟต และอะซีโตน ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งวิธีการเหล่านี้ก็สามารถจะนำมาใช้กับการตกตะกอนบรอมีเลนได้เช่นกัน อย่างเช่นที่ Heinicke (1961) ทำนั้นได้ปรับ pH เป็น 3.5 - 5.5 ก่อนแล้วจึงตกตะกอนด้วยอะซีโตนเป็น 2 ขั้นตอน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเปรียบเทียบกรรมวิธีการตกตะกอนสำหรับเอนไซม์ที่สกัดได้อันกรรมวิธีเหล่านี้ย่อมมีผลต่อปฏิกิริยาการทำงานของบรอมีเลน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะการเก็บรักษา (Wikeman, 1978) เนื่องจากบรอมีเลนเป็น sulfhydryl protease สามารถที่จะรักษาและกระตุ้นปฏิกิริยาการทำงานได้ด้วยตัวรีดิวซ์บางชนิดเช่น Heinicke (1966) ใช้แกสไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งไม่เหมาะสม

1 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร.

ต่อการนำเอนไซม์ที่ได้มาใช้ในอาหาร ฉะนั้นเพื่อการศึกษาความคงตัวของปฏิกิริยา จึงทำการศึกษาโดยการใส่สารบางชนิดที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเอนไซม์

ใช้ลำต้นสับปะรดอายุประมาณ 3 ปี ปอกเปลือก หั่นฝอยแล้วสกัดด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (kg/l) โดยเครื่องตีปั่น 2 นาที แยกตะกอนออกด้วยการเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศา 10 นาที

ศึกษาการตกตะกอน

ตกตะกอนตัวอย่างน้ำสกัดที่ได้ด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้คือ

- (1) เอ็ทธานอล 95% ในอัตราส่วน 1 : 1 (ตามวิธีของ Su และคณะ, 1975)
- (2) ตกตะกอนด้วยเอ็ทธานอลสองขั้นตอนคือครั้งแรกด้วยเอ็ทธานอล 30% เหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาทีที่ 4 องศา แล้วตกตะกอนด้วย 95% เอ็ทธานอลอีก 50%
- (3) ตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น (5 องศา) สองขั้นตอนคือครั้งแรกด้วยอะซีโตน 13% แล้วครั้งที่สองด้วยอะซีโตนอีก 56%
- (4) สองขั้นตอนด้วยอะซีโตน 23 และ 56%
- (5) ใช้อะซีโตนสองขั้นตอนคือ 33 และ 56% และ
- (6) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60% นำตะกอนเอนไซม์ที่แยกได้จากแต่ละวิธีไปทำให้แห้งด้วย freeze dryer แล้วทำการทดสอบปฏิกิริยาโดยการละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อ 100 มล.

ศึกษาผล pH และอุณหภูมิต่อการตกตะกอน

จากการทดลองข้างบนปรากฏว่าการใช้อะซีโตนสองขั้นตอนคือ 33 และ 56% จะให้ผลดีกว่าวิธีอื่น จึงได้ศึกษาการปรับ pH ของสารสกัดก่อนตกตะกอนให้เป็น 3.3, 4.3, 5.3 และ 6.3 ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางเสียก่อนและได้เลือกที่ pH 4.3 ซึ่งให้ผลดีที่สุด ทำการปรับอุณหภูมิตั้งแต่ 5, 10, 20 และ 30 องศา ก่อนและระหว่างการตกตะกอน

ศึกษาความคงตัวของปฏิกิริยาการทำงานบรอมิเลน

แบ่งสารสกัดบรอมิเลนที่ได้เป็น 3 ส่วน ส่วนแรกตกตะกอนด้วยอะซีโตนสองขั้นตอน ส่วนที่สองเติมโซเดียมซัลไฟด์ 0.572 กรัมต่อลิตร ก่อนตกตะกอน และส่วนที่สามเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ 0.572 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 4.3 แล้วจึงตกตะกอน ทำให้แห้งและเก็บรักษาเอนไซม์ที่ผลิตได้ไว้ที่อุณหภูมิ

ห้องและห้องเย็น (5 องศา) ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงานเป็นระยะภายใน 2 เดือน นอกจากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้กับเอนไซม์ของบริษัท Mile ที่จำหน่ายอยู่ทั่วไปด้วยวิธีของ Polyamine Corporation

ผลและวิจารณ์

เปรียบเทียบการตกตะกอนบรอมิเลน

จากการเปรียบเทียบการตกตะกอนบรอมิเลนด้วยสารตกตะกอน 3 ชนิดคือ เอ็ทธานอล อะซีโตน และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปรากฏว่าการตกตะกอนด้วยอะซีโตนที่ 5 องศา ความเข้มข้น 33% แล้วเหวี่ยงแยกตะกอนออกไปจากนั้นตกตะกอนในสารละลายที่เหลือด้วยการปรับอะซีโตนเป็น 56% ให้ผลดีที่สุด (ตารางที่ 1) คือให้ปริมาณเอนไซม์คิดเป็น Total CDU ต่อกรัมของน้ำหนัตกตะกอนแห้งที่ได้จากการสกัด 200 มล. มีค่าสูงสุดถึง 4463.7×10^3 CDU และยังคงมีปริมาณเอนไซม์หลงเหลืออยู่ในสารที่แยกตะกอนแล้วต่ำสุด (ตารางที่ 2) วิธีการที่ให้ผลรองลงมาควรเป็นการตกตะกอนด้วยอะซีโตนสองขั้นตอนโดยใช้ 23% และ 56% ส่วนการตกตะกอนด้วยเอ็ทธานอล 50% ตามวิธีของ Su และคณะ (1975) ให้ปริมาณตะกอนที่มีปฏิกิริยาดำสุด

ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการตกตะกอนเอนไซม์

ถึงแม้ว่าการใช้อะซีโตนเย็นตกตะกอน 2 ขั้นตอนคือครั้งแรก 33% แยกตะกอนออก แล้วตกตะกอนสารละลายอีกครั้งด้วยอะซีโตน 56% จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงแล้วก็ตาม แต่เพื่อที่จะเพิ่มเปอร์เซ็นต์การตกตะกอนเอนไซม์จากของเหลวที่ได้จากการสกัดลำต้นสับปะรดให้ได้มากขึ้น จึงได้ทดลองปรับ pH ของสารละลายตั้งแต่ 3.3 ถึง 7.3 แล้วตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น ปรากฏว่าที่ pH 4.3 จะให้ผลดีที่สุด (ดังภาพที่ 1) ที่ pH 4.3 จากการใช้ของเหลวที่สกัดได้ 200 มล. ให้ตะกอนสูงสุดคือ 1.16 กรัม มีปฏิกิริยาของบรอมิเลน 2805.82×10^3 CDU/กรัมของเอนไซม์แห้ง และที่ pH 5.3 ปริมาณตะกอนและปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะลดลงจนถึง pH 6.3 จากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ pH 7.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า บรอมิเลนที่ผลิตได้จะตกตะกอนได้ดีที่สุดที่ pH 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Heinicks (1961)

Table 1 Comparison of different precipitation processes on yield and bromelain activity

Precipitation Solution	Yield %	Enzyme activity ($\times 10^3$)	
		CDU/gm	Total CDU
Ethanol 50%	0.6075	633.0	384.5
Ethanol 30%	0.0632	639.7	40.4
50%	1.0244	1174.6	1203.2
Ammonium sulfate saturated			
60%	1.7150	421.7	723.7
Acetone 13%	0.0362	647.1	111.2
56%	1.2952	3071.3	838.1
Acetone 23%	0.3478	520.5	181.0
56%	1.0026	3861.2	3871.3
Acetone 33%	0.4049	492.4	199.4
56%	1.0703	4170.5	4463.7

Table 2 Enzyme activity and protein content, of precipitate and filtrate in two-stage acetone precipitation processes of pineapple steam extract.

Acetone concentration	Precipitate			Filtrate		
	Enzyme activity (CDU $\times 10^3$)	Protein gm/100 ml	Specific activity CDU/mg	Enzyme activity CDU $\times 10^3$	Protein gm/100 ml	Specific activity CDU/mg
Acetone 13%	111.21	0.019	5853	-	-	-
56%	838.05	0.635	1315	140.55	0.406	346
Acetone 23%	180.95	0.140	1293	-	-	-
56%	3871.25	0.601	6441	114.07	0.409	279
Acetone 33%	199.36	0.113	1764	-	-	-
56%	4463.71	0.658	6784	87.92	0.381	231

ที่พบว่าต้องปรับ pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง pH 3.3-5.3 ก่อนจึงตกตะกอนเอนไซม์ได้ดี

นอกจาก pH ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการตกตะกอนเอนไซม์แล้ว อุณหภูมิระหว่างการตกตะกอนก็เป็นส่วนสำคัญ จากการทดลองตกตะกอนเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันตั้งแต่ 5° ซ. ถึง 30° ซ. ปรากฏว่า (ภาพที่ 2) ที่อุณหภูมิ 5° ซ. จะได้ตะกอนเอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาการทำงานสูงสุดและเมื่ออุณหภูมิในการตกตะกอนสูงขึ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงเป็นลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับรายงานของ Heinicke (1961) ซึ่งตกตะกอนเอนไซม์บรอมีเลนด้วยอะซิโตนที่อุณหภูมิประมาณ 34-40° ฟ.

การเพิ่มความคงตัวของบรอมีเลน

Wikeman (1978) ทำการกระตุ้นและเก็บรักษา

ปฏิกิริยาการทำงานของบรอมีเลนด้วยโพลีเอทีลีน-ไกลลอล กับ เกลือของตะกั่วและแบเรียม แต่เนื่องจากสารเหล่านี้เป็นพิษจึงใช้กับอาหารไม่ได้ Heinicks (1961) ใช้ได้แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์และแนะนำให้ใช้ตัวรีดิวซ์อื่น ๆ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์เกลือซัลไฟด์ ความเข้มข้นระหว่าง 0.005-0.01 โมลาร์เป็นต้น

จากการใช้ตัวรีดิวซ์คือ โซเดียมซัลไฟด์ และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ในปริมาณ 0.572 เดมในสารสกัดก่อนการตกตะกอนเอนไซม์ เก็บตะกอนเอนไซม์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิในห้อง (25° ซ) แล้วนำมาหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ในระยะเวลาต่าง ๆ กันได้ผล ดังแสดงในภาพที่ 3 การใช้โซเดียมซัลไฟด์และโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์จะช่วยให้เอนไซม์มีปฏิกิริยาและความคงตัวดีขึ้นเนื่องจากเกลือซัลไฟด์จะป้องกันการออกซิเดชัน

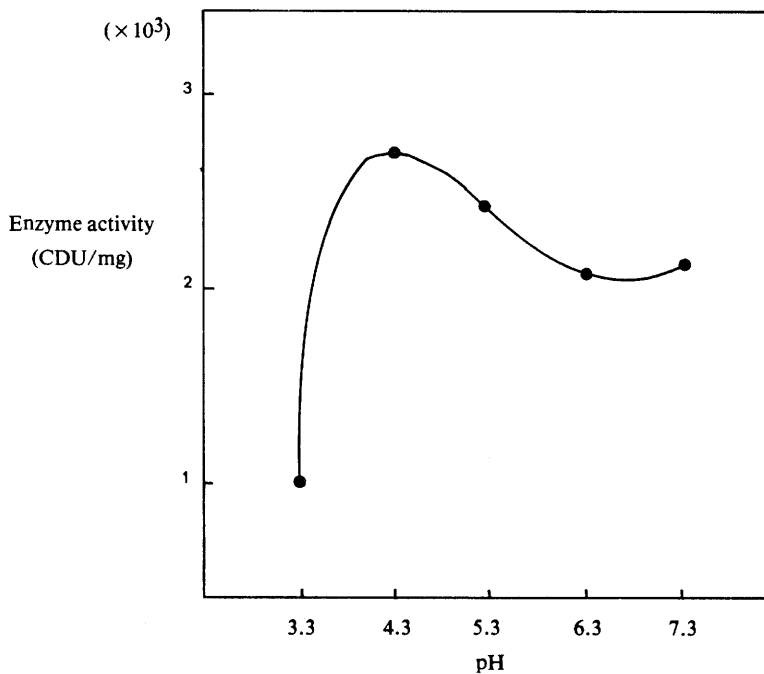


Figure 1. Effect of pH level of stem extract prior two stage acetone precipitation on total bromelain activity

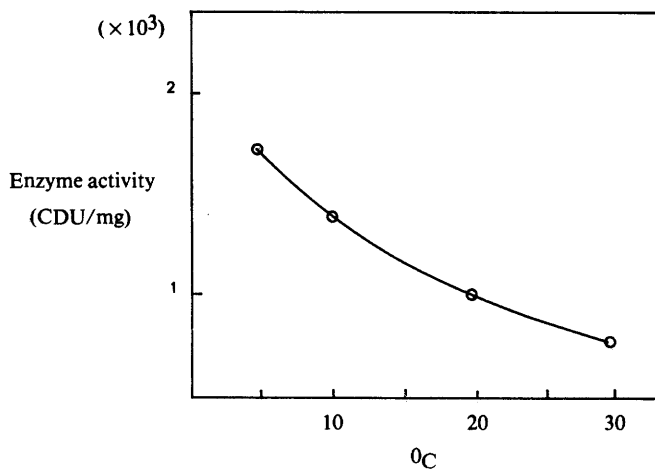


Figure 2. Relation, of precipitation temperature to total bromelain activity in the precipitation

ระหว่างการเติมเอนไซม์ทั้งจากโมเลกุลของออกซิเจน หรือจากปฏิกิริยาเคมีซึ่งมีเอนไซม์อื่นเป็นตัวเร่ง ซึ่งจะ ทำให้เอนไซม์เสียปฏิกิริยาและยังสามารถลดสาร ออกซิไดซ์ด้วย (Heinicke, 1966) แต่อย่างไรก็ตาม ซัลไฟด์ไอออนก็อาจถูกออกซิไดซ์ได้เช่นกัน ถ้ามีเหล็ก ในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ทำให้ซัลไฟด์ที่มีอยู่สูญ หายไปจึงมีผลทำให้เอนไซม์มีการสูญเสียปฏิกิริยาไปบ้าง ส่วนโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์จะช่วยเพิ่มปฏิกิริยาและ ความคงตัวของเอนไซม์ ซึ่งจะสามารถเก็บไว้ได้ถึง 60

วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยปฏิกิริยาการทำงานยังคงเหลือ อยู่ถึง 86.4% และการใช้โซเดียมซัลไฟด์ทำให้ปฏิกิริยา การทำงานของเอนไซม์คงอยู่ 73.7% ภายในเวลา 2 เดือน เช่นกัน

ผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาบรอมีเลนผง

เอนไซม์บรอมีเลนที่ผลิตได้เมื่อเก็บในภาชนะปิด ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และห้องเย็น (6 °C) ปฏิกิริยา การทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อระยะเวลาเก็บ

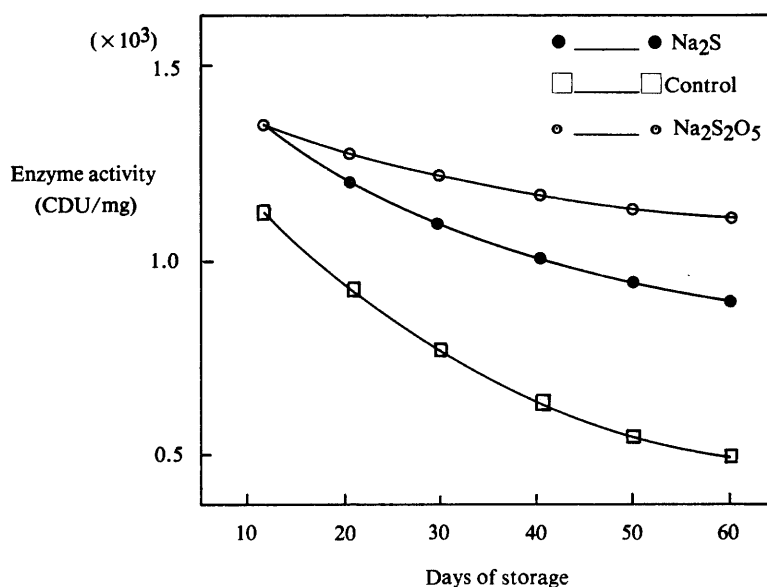


Figure 3. Role of sodium sulfide and sodium metabisulfite on stability of bromelain activity during storage at room temperature.

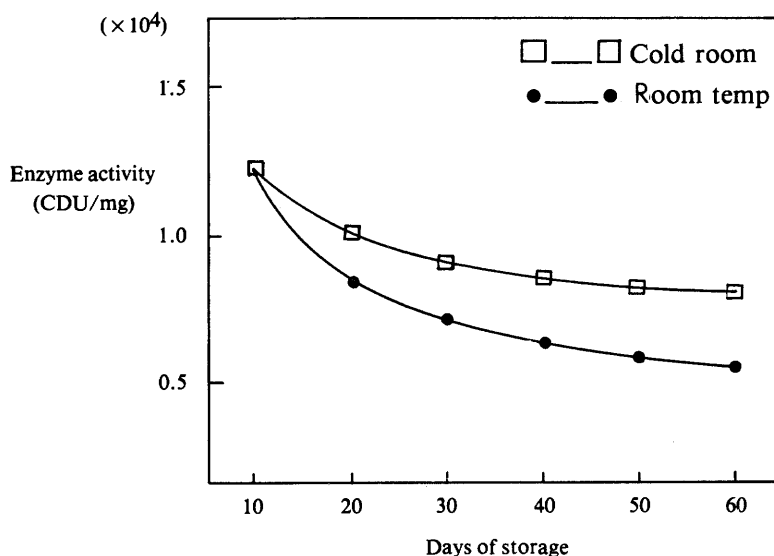


Figure 4. Comparison of storage temperature on bromelain activity during storage for two months

รักษานานขึ้นทั้ง 2 กรณี (ภาพที่ 4) ในสัปดาห์แรก ปฏิกิริยาการทำงานจะลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันของสถิติ หลังจากนั้นจะลดลงเป็นลำดับ และมีความแตกต่างจากปฏิกิริยาการทำงานเริ่มต้นมากขึ้น เมื่อเก็บไว้ถึง 2 เดือน เอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องยังคงมีปฏิกิริยาเริ่มต้นนั่นคือ การใช้อุณหภูมิต่ำหรือความเย็นในการเก็บรักษาเอนไซม์จะช่วยให้มีการสูญเสียปฏิกิริยาของเอนไซม์น้อยลง

เอนไซม์ผงที่ผลิตได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับปฏิกิริยากับเอนไซม์โบรมิเลนที่ผลิตเป็นการค้าของบริษัท Miles ปรากฏว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้มีปฏิกิริยาสูงกว่า (ภาพที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้ามีการใส่สารที่ทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงเพื่อให้เหมาะกับการใช้ประโยชน์ และเพิ่มความคงตัวในการเก็บรักษา

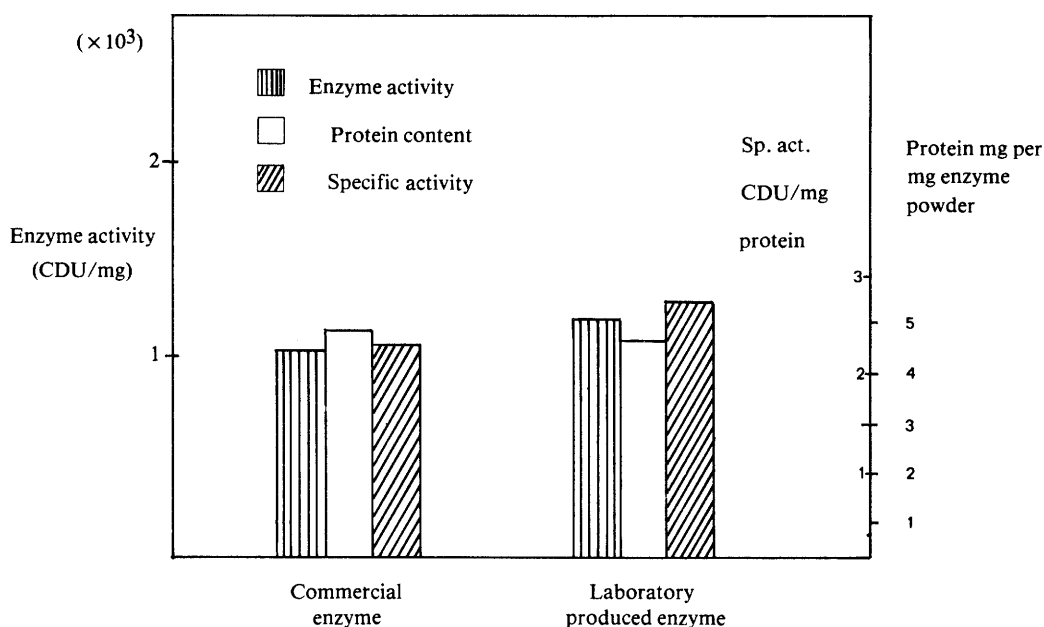


Figure 5. Comparison of enzyme activity, protein content and specific activity of commercial bromelain (Mile co) and Laboratory produced enzyme .

สรุป

จากการศึกษาการตกตะกอนและการเก็บรักษา บรอมีเลนที่ผลิตได้จากลำต้นสับประรด พอสรุปได้ดังนี้คือ

1. เอนไซม์ที่ผลิตได้โดยการตีปั่นลำต้นสับประรดกับน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 นาน 2 นาที และตกตะกอน 2 ชั้นคอนด้วย อะซีโตน 33% และ 56% ที่ pH 4.3 อุณหภูมิ 5 °C. จะได้เอนไซม์ผงสีขาว 4.75–5.81 กรัมต่อลำต้นที่ปอกเปลือก 1 กิโลกรัม หรือคิดเป็นผลผลิตประมาณ 0.48–0.58%

2. เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปฏิกิริยาการทำงานดีกว่า เอนไซม์ที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาดและจะสูญเสียปฏิกิริยาการทำงานไปประมาณ 40% เมื่อเก็บไว้ในห้องอุณหภูมิห้อง และ 27% เมื่อเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 2 เดือน

3. การเติมโซเดียมซัลไฟด์และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 572 ppm ลงในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดก่อนตกตะกอน จะช่วยเพิ่มปฏิกิริยาการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์โดยปฏิกิริยายังคงเหลือถึง 86.4% สำหรับการใส่โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์และเหลือ

72.7% สำหรับการเติมโซเดียมซัลไฟด์จากการเปรียบเทียบกับปฏิบัติเริ่มต้นเมื่อเก็บไว้ 2 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารอ้างอิง

- Heinicke, R.M. 1961. Process for the preparation of pineapple stem bromelain. U.S. patent, 3, 002, 891.
- Heinicke, R.M. 1966. Stabilization of bromelain preparations. U.S. patent. 3, 293, 143.
- Su, Y.C., C.Y. Chu, Y.T. Lai and K.S. Lai. 1975. Studies on the production of stem bromelain from pineapple waste. J. Chinese. Agr. Chem. Soc. Spc. Ins. 105.
- Wikeman, A. 1978. Stabilization of Enzymes. Topic in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Biddles of Buildford, Great Britain. 280.
- Anonymous. no date. CDU/mg Method for Bromelain Assay. Polyamine (Taiwan) Corporation.